Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 829-846

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر- دی 1397، ص. 846-829

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی دو سویه لاکتوباسیلوس ایزوله شده از پنیر سنتی متال بر زمان ماندگاری دوغ

سعید افضلی[1]- محمدرضا عدالتیان دوم[2*]- محمدباقر حبیبی نجفی[3]- مصطفی مظاهری تهرانی[3]

تاریخ دریافت: 1396/11/11
تاریخ پذیرش: 1397/03/22

چکیده

در این تحقیق، اثر ضدمیکروبی دو *لاکتوباسیلوس برویس* M_2 و M_4 ایزوله شده از پنیر متال بر آلودگی‌های میکروبی و قارچی در دوغ بررسی شد. سویه‌ها در سطوح 10^6 و 10^8 cfu/ml تلقیح و یک نمونه شاهد بدون تلقیح در نظر گرفته شد. نمونه‌ها در دماهای 4، 25 و 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری و در فواصل زمانی مشخص آزمون‌های میکروبی و حسی انجام شد. نمونه تلقیح شده با M_410^6 بالاترین اثرضدمیکروبی در هر 3 دمای نگهداری را داشت. برای بررسی تولید گاز، نمونه شاهد ونمونه M_410^6 در 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر 7 روز ارزیابی شد. نتایج کپک و مخمر در 4 درجه سانتی‌گراد، نمونه شاهد روز 50 نگهداری، مثبت اما نمونه M_410^6، از نظر شمارش کپک و مخمر روز 60 نگهداری منفی بود. در 25 درجه سانتی‌گراد، نمونه شاهد در روز 14 نگهداری کپک زده ولی نمونه M_410^6، روز 21 نگهداری سالم بود. در 37 درجه سانتی‌گراد، نمونه شاهد روز 7 نگهداری شمارش کپک و مخمر، مثبت بود، اما نمونه M_410^6 روز 14 نگهداری تست کپک و مخمر منفی بود. ارزیابی تولید گاز، در 37 درجه سانتی‌گراد نمونه شاهد روز سوم، دچار بادکردگی شده ولی نمونه M_410^6 روز 14 نگهداری، تولید مقدار کمی گاز کرده بود. در 25 درجه سانتی‌گراد نمونه شاهد روز14 نگهداری تولید گاز کرده اما نمونه M_410^6 تولیدگاز نداشت.آزمون های *کلی فرم*، *استافیلوکوکوس* و *اشرشیاکلی* نمونه دوغ M_410^6 منفی بود. ارزیابی حسی نمونه‌های تلقیح شده با لاکتوباسیلوس‌ها به نمونه شاهد برتری داشت به‌طوریکه نمونه M_410^6 موجب افزایش عمرانبارمانی وکاهش فساد دوغ شده است.

واژه‌های کلیدی: پنیر متال ،*لاکتوباسیلوس برویس*، فعالیت ضدمیکروبی، ماندگاری دوغ

مقدمه

دوغ یک فرآورده لبنی تخمیری است که از اختلاط ماست با آب و مقداری نمک به‌دست می‌آید. این نوشیدنی فرح‌بخش در ایران و سایر کشورهای خاورمیانه به‌طور گسترده مصرف می‌شود (Tamime and Robinson, 2001).

فراورده‌های لبنی تخمیری در بسیاری از کشورهای آسیا، خاورمیانه و عربی با نام‌های متفاوتی چون لسی[4]، دوغ، ماست و ایران[5] ایران[5] و در کشورهای اسکاندیناوی با عنوان شیر اسیدوفیلوس، ویلی[6] و تافیل[7] شناخته می‌شود. دوغ یک فرآورده لبنی تخمیری است که از اختلاط ماست با آب و مقداری نمک به‌دست می‌آید. در ترکیه، ایران متداولترین نوشیدنی تخمیری است.این فراورده را بر اساس طبقه‌بندی‌های فوق، می‌توان در گروه فرآورده‌های رقیق شده یا نوشیدنی‌ها قرار داد (مظاهری وهمکاران، 1395).

فساد غذایی مربوط به مخمرها مسئله قابل توجهی برای صنایع لبنی و نوشیدنی می‌باشد. توانایی آنها برای بقاء در دماهای پایین و pH اسیدی به آنها اجازه می‌دهد باعث فساد مکرر غذاهایی مانند ماست ،پنیر و آبمیوه‌ها شوند (Cangella *et al*. 1998) .

مخمرها، از بزرگترین گروه میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که باعث فساد نوشابه‌های بدون الکل، آبمیوه‌ها، فراورده‌های لبنی و نوشیدنی‌های لبنی تخمیری مانند دوغ می‌شوند و تولید فراورده‌های متابولیکی جانبی مانند CO_2 و اسید می‌کند (Ashurst, 2005). سه گونه مخمر عامل کف‌دار شدن، بادکردگی بطری و ایجاد طعم نامطلوب در دوغ و ماست در طی نگهداری می‌شوند که شامل مخمر *کلویورومایسس لاکتیس*[8]، *ساکارومایسس سرویزیه*[1] و گونه‌های جنس

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: edalatian@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v14i5.70645

4 Lassi.
5 Ayran
6 Viili
7 Tafil

1 *kluyveromyces lactis*

ژئوتریکوم[2] مـی باشـد (Gülmez *et al*., 2003., Tamang and Fleet, 2009).

باکتری‌های اسید لاکتیک و همچنین متابولیـت‌هـای حاصـل از آنها، به‌عنوان مواد حفاظت‌کننده طبیعی یا نگهدارنده‌های زیسـتی در مواد غذایی و خوراک دام، کلم ترش و علوفه اسـتفاده مـی‌شـود. اثـر محافظتی ایجاد شده عمدتا ناشی از تشکیل متابولیت‌هـایی از قبیـل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، رقابت برای مواد مغذی و تولید مواد ضدمیکروبی می‌باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک یا به‌طور طبیعـی و ذاتی در مواد غذایی وجود دارد و یا به‌صورت خالص بـه محصـولات غـذایی اضـافه مـی‌شـود،آنها بـی‌ضـرر هسـتند وعمومـا بـه‌عنـوان میکروارگانیسم‌های ایمن (GRAS) شناخته شده‌اند و حتی در مواردی موجب بهبود سلامت انسان و حیوانات می‌شود. براورد شده است کـه 25 درصد رژیم غذایی اروپا و همچنین 60 درصد رژیم غذایی بسیاری کشورهای در حال توسعه را غـذاهای تخمیـری تشـکیل مـی‌دهـد (Stiles, 1996).

باکتری‌های اسید لاکتیک، به‌عنوان آغازگر در فراورده‌های لبنـی مانند شیر اسیدوفیلوس، ماست، پنیر کاتیج و انواع پنیر سخت و نـرم استفاده می‌شود (Carr *et al*., 2002). باکتری‌هـای اسـید لاکتیـک انواع ترکیبات ضدمیکروبی مانند اسید لاکتیک و اسـید اسـتیک کـه موجب کاهش pH در تخمیر شده و همچنین پراکسید هیدروژن، اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و دی‌استیل تولید می‌کنـد (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

فساد قارچی مواد غذایی یک پدیده جهانی گسترده است. تخمین زده شده است که 10-5 درصد تولید غـذای جهـان در نتیجـه فسـاد قارچی از بین می‌رود (Pitt and Hocking 1999). علاوه بر ایـن، عواقب مالی منفی ناشی از فساد قارچی مواد غذایی یک نگرانی جدی به‌شمار می‌رود. رشد قارچ‌ها روی مواد غذایی می‌تواند منجر به تولیـد مایکوتوکسین‌ها شود که برای انسان‌ها و حیوانات سمی شناخته شده است (Sweeney and Dobson, 1998).

کرولی و همکاران (2012) به بررسی مقایسه قدرت تکنولوژیکی دو گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده و ارزیابی توانایی انها برای جلوگیری از فساد مخمرهای *رودوتورولا* در دو ماده غذایی ماسـت و آب پرتقال بوده است. نتایج نشان دادند که هر دو لاکتوباسیل دارای فعالیت ضدقارچی قوی روی غیرفعال کردن مخمرهای عامـل فسـاد می‌باشد.

خمیری و همکاران در سال 1395، به بررسی فعالیت ضدمخمری *لاکتوباسیلوس برویس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از چال (شیر تخمیری شتر) بر مخمرهای عامل فساد مواد غذایی در دوغ پرداختند. نتایج نشان داد *لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسـیوم* دارای بازدارندگی قوی علیه *رودوترولا گلوتینیس* می‌باشند.

پنیر متال، نوعی فراورده لبنی پارس آباد دشت مغان است که در برخی از کارگاه‌های محلـی تولید می‌شود. در تولید این پنیر هیچ نوع استارتری اسـتفاده نمی‌شود و تنها رنین طبیعی افـزوده شـده اسـت. باکتری‌های اسید لاکتیک آغازگر درصورت استفاده، در آغـاز فرآینـد تولید پنیر، به شیر اضـافه مـی‌شـوند. بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیـک غیرآغازگر در ماتریکس پنیر در نتیجه آلودگی حین فرآیند تولید یا از محیط به شیر وارد می‌شوند. از نظر صنعتی، کاربرد کشت‌های آغازگر به‌ویژه باعـث ایجـاد کیفیت ثابت در محصـــول مـــی‌گـــردد ولـــی منجـر به از دسـت رفـتن ویژگـی‌هـای منحصـر بـه فـرد و اصـیل محصولات سنتی خواهـد شـد. بـه همـین دلیـل، جسـتجو وکـاوش سویه‌های وحشی موجود در طبیعـت و نیـز در محصـولات تخمیـری نظیر پنیرهـای حاصـل از شـیر خـام کـه بـه‌صـورت سـنتی تولیـد می‌شوند، پتانسیل جداسـازی نژادهای جدید جهت تولید فراورده‌هـای لبنی جدید با طعـم طبیعـی را دارا مـی‌باشـند (عزیـزی و همکـاران، 1395).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضدمیکروبی گونه‌هـای جـنس لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر متال بر آلودگی میکروبی و قـارچی و زمان ماندگاری دوغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر ضدمیکروبی از دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* M2 (*Lactobacillus brevis* KX572376) و M4 (*Lactobacillus brevis* KX572378) ایزوله شده از پنیرسنتی متال که قـبلا توسط تکنیک‌های مولکولی و واکنش زنجیره‌های پلیمـراز PCR بـا روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA تا حد جنس و گونه شناسایی شـده بودند استفاده شد (عزیزی و همکاران، 1395).

آماده‌سازی سویه‌های لاکتوباسیلوس جهت تلقیح

کلنی حاصل از رشد ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس برویس* بـه مـدت 24 سـاعت در محـیط کشـت MRS بـراث و در دمـای 37 درجـه سـانتی‌گـراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ظهـور کـدورت در لوله‌های آزمایش، از هر ایزوله به میزان یک میکرولیتر درون میکروتیوپ 1/5 استریل و سپس به مدت 10 دقیقـه بـا سـرعت 4000 دور در دقیقـه سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شـد. رسـوب حاصـل دو بـــار بـه‌وسـیله محلول رینگر اسـتریل شـسته و پـس از ســـانتریفوژ مجـــدد، سوسپانـــسیون میکروبـــی تهیـــه شـــد (علیـزاده و همکاران، 1389).

[2] *Saccharomyces cerevisiae*
[3] *Geotrichum sp.*

تولید دوغ

تولید دوغ مطابق با استاندارد ملـی ایـران شـماره 2453 صـورت پذیرفت. دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* پس از شست و شو با رینگر همراه آغازگر به میزان یک درصد به شیر پاستور شده (10 دقیقـه در دمای 90 درجه سانتی‌گراد) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد تلقیح شـد. سویه‌های لاکتوباسیل در سطوح جمعیتی 10^6 و 10^8 بـاکتری در هـر میلی‌لیتر تلقیح شدند و یک نمونه بدون تلقیح سویه به‌عنـوان نمونـه شاهد در نظر گرفته شد، تخمیر در دمای 37 درجـه سـانتی‌گـراد تـا رسیدن pH به 4/6 ادامه یافت (Crowley *et al*., 2012).

همچنین به‌منظور ارزیـابی تولیـد گـاز در بطـری، تولیـد دوغ در مقیاس صنعتی در ظروف یک لیتری در پایلوت لبنیات دانشگاه انجام گرفت. به‌منظوربررسی تولید گاز در بطری هم یک نمونه شاهد و یک نمونه تلقیح شده با سویه M_410^6 در انکوباتور 37 و یک نمونه شاهد و M_410^6 در دمای اتاق قرار داده شد.

بررسی خصوصیات میکروبی، حسی و فیزیکوشیمیایی دوغ در طی 60 روز نگهداری دردمای4 درجه سانتی‌گراد هر 10روز یک بـار و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد 21 روز هر 7 روز یک بار و در دمـای 37 درجه سانتی‌گراد 14 روز هر 7 روز یک بار بررسی شد.

ارزیابی میکروبی

شمارش کلی‌فـرم‌هـا، بـر اسـاس اسـتاندارد ملـی ایـران شـماره (2 و1)- 5486، شمارش *اشریشیاکلی*، بر اساس استاندارد ملی ایـران شماره 5234 و5486، شمارش کپک و مخمر، بر اساس استاندارد ملی ایران شماره 997 و شـمارش اسـتافیلوکوکوس کواگـولاز مثبـت، بـر اساس استاندارد ملی ایران شماره3-6806 انجام شد.

ارزیابی فیزیکو شیمیایی

خصوصیات pH و اسیدیته بر اساس استاندارد ملی ایـران شـماره 2852 انجام شد.

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی، مطابق استاندارد ملی ایران شماره 4691 انجام شد. ارزیابی حسی ویژگی‌هایی همچون طعم و مزه، بافت، رنگ و پذیرش کلی توسط 10 نفر از دانشجویان کارشناسی‌ارشد صنایع غذایی مـورد ارزیابی قرار گرفت، که به هر صفت نمره 1 تا 5 را بـه‌ترتیـب بـرای کیفیت‌های خیلی بد، بد، متوسط، خوب و خیلی خوب دادند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصـادفی بـا آزمـون فاکتوریـــل آنـــالیز شد. بـــرای آنـــالیز داده‌هـــا از نـــرم‌افزار Mini Tab (Version 16) و برای رسم نمودارها از نرم‌افـزار Excel 2013 استفاده شد. تیمارهای این تحقیق شامل: تعداد سویه در دو سطح (دو ایزوله *لاکتوباسیلوس برویس* M4 و M2)، سطوح تلقیح در سه سطح (صفر، 10^6 و 10^8)، دما در سه سطح مجزا به‌صورت (دمای 4 درجـه سانتی‌گراد در 7 سطح زمان نگهداری، دمای 25 درجه سانتی‌گراد در 4 سطح زمان نگهداری، دمای 37 درجه سانتی‌گراد در 3 سطح زمان نگهداری) می‌باشند.

نتایج و بحث

در جدول1، نتایج تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیـدی طـی 60 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شـده اسـت. نتـایج نشـان مـی‌دهـد بیشـترین تغییـرات pH نمونه‌های دوغ، مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده بـا سـویه M_410^8 از 4/41 به 3/97 (با کاهش 0/44 صدم) در طـی 60 نگهـداری بـود و نمونه شاهد باکـاهشpH، از 4/48 بـه 4/20 (کـاهش 0/28 صـدم) کمترین تغییر را طی دوره نگهداری در دمـای 4 درجـه سـانتی‌گـراد به‌خود اختصاص می‌دهد. بررسی‌ها نشان مـی‌دهـد نمونـه‌هـای دوغ تلقیح شده با گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیـک، بـه دلیـل تولیـد اسیدهای آلی، موجب کاهش چشمگیر pH می‌شوند.

جدول 1- تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

نمونه	روز تولید	روز 10	روز 20	روز 30	روز 40	روز 50	روز 60	تغییرات pH (ΔpH)
Control	$4/48^{a}$	$4/41^{bc}$	$4/32^{gh}\pm0/028$	$4/31^{gh}\pm0/014$	$4/29^{hi}\pm0/014$	$4/22^{kl}\pm0/028$	$4/20^{mn}\pm0/035$	0/28
M_210^6	$4/40^{cd}$	$4/34^{fg}\pm0/014$	$4/27^{ig}\pm0/028$	$4/26^{gk}\pm0/021$	$4/25^{jk}\pm0/007$	$4/12^{mn}\pm0/007$	$4/09^{n}\pm0/014$	0/31
M_210^8	$4/48^{ab}$	$4/37^{ef}\pm.0,021$	$4/31^{gh}\pm0/028$	$4/28^{hi}\pm0/014$	$4/26^{jk}\pm0/014$	$4/18^{lm}\pm0/021$	$4/12^{mn}\pm0/028$	0/36
M_410^6	$4/39^{de}$	$4/35^{de}\pm0/014$	$4/32^{gh}\pm0/021$	$4/30^{hi}$	$4/28^{hi}\pm0/014$	$4/19^{lm}\pm0/014$	$4/05^{mn}\pm0/014$	0/34
M_410^8	$4/41^{bc}$	$4/33^{gh}\pm0/021$	$4/29^{hi}\pm0/021$	$4/27^{hi}\pm0/021$	$4/25^{jk}\pm0/007$	$4/12^{mn}\pm0/035$	$3/97^{o}\pm0/035$	0/44

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا ($p\text{-value}<0.05$) می‌باشد

جدول 2، روند تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیدی طـی 21 روز نگهداری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به‌صورت میانگین دو تکرار را

نشان می‌دهد. نتایج روند تغییرات pH نمونه‌های دوغ نشان‌دهنده این است که بیشترین تغییراتpH، مربوط به نمونـه دوغ تلقـیح شـده بـا سـویه M_410^8، از 4/20 بـه 3/73 (کـاهش 0/47) در طـی 21 روز نگهداری، بود و کمترین روند تغییرات را نمونه شاهد از 4/35 به 3/98 (کاهش 0/37) طی دوره نگهداری در دمـای 25 درجـه سـانتی‌گـراد نشان داد.

جدول 2- تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25درجه سانتی‌گراد

نمونه	روز تولید	روز 7	روز 14	روز 21	تغییرات pH (ΔpH)
Contorol	4/35ᵃ	4/13ᶜᵈ±0/021	4/07ᶠᵍ±0/035	3/98ᵍ±0/014	0/37
$M_2 10^6$	4/24ᵃᵇ	4/16ᵇᶜ±0/014	3/96 ᵉᶠ±0/021	3/83ᶠᵍ±0/021	0/41
$M_2 10^8$	4/23ᵇᶜ	4/11ᶜᵈ±0/021	3/84ᶠᵍ±0/028	3/76ᵍ±0/028	0/47
$M_4 10^6$	4/26ᵃᵇ	4/17ᵇᶜ±0/176	3/94ᶠᵍ±0/028	3/84ᵍ±0/014	0/42
$M_4 10^8$	4/20ᵇᶜ	4/05ᵈᵉ±0/042	3/86ᶠᵍ±0/014	3/73ᵍ±0/049	0/47

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا (p-value<0.05) می باشد.

در جدول 3، نتایج تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیدی طـی 14 روز نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بـه‌صـورت میـانگین دو تکرار گزارش شده است. نتـایج نشـان مـی‌دهـد رونـد تغییـرات pH نمونه‌های دوغ در طی دوره نگهداری در دمای 37درجه سـانتی‌گـراد بیشترین کاهش، مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با M_410^8 از 4/17 به 3/6 (0/57) در روز 14 نگهداری و کمترین تغییرات pH، مربوط به نمونه شاهد از 4/35 به 3/95 (0/40 کاهش) در طی دوره نگهـداری در دمای37 درجه سانتی‌گراد بوده است. اسید لاکتیک متابولیت عمده و اصلی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که باعـث کـاهش pH و مهار بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شود. باکتری‌های اسید لاکتیک هتروفرمنتاتیو مانند *لاکتوباسیلوس برویس*، در حضـور گیرنـده‌هـای الکترونی خارجی اسید استیک نسبتاً زیادی تولید می‌کند، این در حالی است که اسید پروپیونیک بـه مقـدار نـاچیزی تولیـد مـی‌شـود. اسـید پروپیونیک و استیک جذب اسید آمینـه را مهـار مـی‌کنـد (Eklund, 1989).

جدول 3- تغییرات pH نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد

نمونه	روز تولید	روز 7	روز 14	تغییرات pH (ΔpH)
Contorol	4/35ᵃ	4/20ᶜᵈ±0/028	3/95ᵉ±0/028	0/4
$M_2 10^6$	4/23ᵇᶜ	3/87ᵍ±0/014	3/75 ʰⁱ ±0/014	0/48
$M_2 10^8$	4/20ᶜᵈ	4/02ᵈᵉ±0/007	3/7ᵍ±0/021	0/5
$M_4 10^6$	4/26ᵇ	3/88ʰ±0/021	3/78ⁱ±0/028	0/48
$M_4 10^8$	4/17dᵉ	3/88ᶠ±0/042	3/6ʰ±0/014	0/57

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا (p-value<0.05) می‌باشد

از آنجا که نمونه دوغ تلقـیح شـده بـا سـویه $M410^8$ (بـاکتری *لاکتوباسیلوس برویس*) به میزان بالاترین سطح، یعنـی 10^8 cfu/ml تلقیح شده است، بنابراین منطقی به‌نظر می‌رسد که بیشترین کـاهش pH مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با این سویه و با این مقدار باشد و اما بین دو سویه M_2 و M_4، که هر دو به‌عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* شناسایی شده‌اند، بدیهی است که قدرت تولید اسید و کاهش pH بین سویه‌های متفاوت از یک گونه، می‌تواند متغیر باشد که این پدیده بـه اختلافات درون گونه‌ای بر می‌گردد. متابولیت‌های زیادی در فعالیـت ضدمیکروبی و ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک نقش دارنـد کـه اسیدهای آلی یکی از این عوامل هستند. نتایج هم مبین این حقیقـت هستند که میزان اسیدها (اسیدیته) در نمونه‌های تیمار شده با سویه‌ها، بیشتر از نمونه شـاهد یـا کنتـرل بـود کـه یکـی از دلایـل، فعالیـت ضدقارچی سویه‌های لاکتیکی مورد استفاده در تولید دوغ می‌باشد. از طرف دیگر بر خلاف مطالعه حاضر، برخی محققان نشان دادنـد کـه افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، نسبت به استارتر ماست بر pH آن، تاثیری ندارد. بنابراین تفـاوت در تغییـرات pH نمونـه‌هـای مختلف دوغ را می‌توان به گونه‌ها و نژادهای مختلف باکتریایی نسبت داد (Delavenne *et al.* 2012).

بر اساس نتایج جداول مربوط به pH، در طول زمان نگهداری، در دماهای 4، 25 و 37 درجه سانتی‌گراد، بیشترین تغییرات در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و کمترین آن، در دمای 4 درجه سانتی‌گراد رخ داده است و نشان می‌دهد که با افزایش دمـا رونـد تولیـد اسـید افـزایش

می‌یابد که این کاهش pH مربوط بـه تولیـد اسـیدهای آلـی توسـط لاکتوباسیلوس‌ها شامل اسید لاکتیک، استیک و پروپیونیک می‌باشـد (Eklund, 1989).

جدول 4، نتایج شمارش کپک و مخمر،کلیفرم، *استافیلوکوکوس اورئـوس* و *اشرشـیاکلی* طـی 60 روز نگهـداری در دمـای 4 درجـه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد، به‌طوریکه کـه نمونـه شـاهد در روز 50 نگهداری، از نظر شاخص‌های میکروبی غیرقابل قبول می‌باشد (شکل 1). در حالیکه، شمارش کپک و مخمر در نمونه دوغ تلقـیح شـده بـا سویه *لاکتوباسـیلوس بـرویس* M_410^6، $0/3×10^2$ CFU/ml در روز 60 نگهداری می‌باشد (جدول 4)، که درمقایسه با میزان مجاز کپک و مخمر در استاندارد دوغ ایران (شماره اسـتاندارد 2453)، کـه حـداکثر 100 Cfu/ml می‌باشد، کمتر بوده و بنابراین قابل قبـول مـی‌باشـد. کپک و مخمرها از میکروارگانیسم‌های معمول فساد مواد غذایی مانند محصولات تخمیری شیر، پنیر، نان و همچنین علوفه و یونجه ذخیره شـده مـی‌باشـد (Bonestroo, Dewit, Kusters, & Rombouts, 1993). اسید پروپیونیک در pHهای پایین، رشد قارچهـا را کـاهش می‌دهد و در pH کمتر از 4/5، روی غشاء قارچها تاثیر گذاشته و آنها را غیرفعال می‌کند (Woolford, 1984a). نمـک اسـید پروپیونیـک مانند پروپیونات سدیم و آمونیـوم اثـر مشـابهی در برابـر مخمرهـا و کپک‌ها در pH پایین از خود نشان می‌دهد (Woolford, 1984b).

جدول 4- نتایج میکروبی نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

	روز	Control	M_210^6	M_210^8	M_410^6	M_410^8
کپک و مخمر	تولید	-	-	-	-	-
	روز 10	-	-	-	-	-
	روز 20	-	-	-	-	-
	روز 30	-	-	-	-	-
	روز 40	-	-	-	-	-
	روز 50	غیر قابل شمارش	$0/4×10^2$	$0/6×10^2$	-	$4/7×10^2$
	روز 60	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	$1/5×10^2$	$0/3×10^2$	غیر قابل شمارش
کلیفرم	تولید	-	-	-	-	-
	روز 10	-	-	-	-	-
	روز 20	-	-	-	-	-
	روز 30	-	-	-	-	-
	روز 40	-	-	-	-	-
	روز 50	-	-	-	-	-
	روز 60	-	$0/1 ×10^2$	-	-	کپک
استافیلوکوکوس اورئوس	تولید	-	-	-	-	-
	روز 10	-	-	-	-	-
	روز 20	-	-	-	-	-
	روز 30	-	-	-	-	-
	روز 40	-	-	-	-	-
	روز 50	$0/1 ×10^2$	-	-	-	-
	روز 60	کپک	-	-	-	-
اشریشیاکلی	تولید	-	-	-	-	-
	روز 10	-	-	-	-	-
	روز 20	-	-	-	-	-
	روز 30	-	-	-	-	-
	روز 40	-	-	-	-	-
	روز 50	-	-	-	-	-
	روز 60	-	-	-	-	-

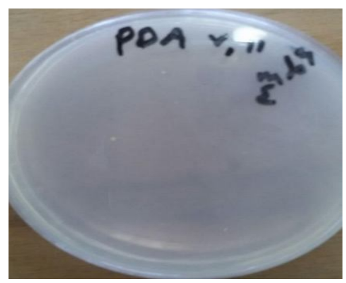
نتایج آزمون‌های میکروبی (پروفایل میکروبی) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به‌صورت میانگین دو تکرار

-: منفی و عدم رشد میکروارگانیسم

همان‌طور که در شکل 1و2 مشخص می‌شود، نمونـه دوغ تلقـیح شده با سویه *لاکتوباسیلوس برویس* M_410^6 طی 60 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد از لحاظ شمارش کپک و مخمر قابل قبـول بوده ($0/3×10^2$CFU/ml) که کمتر از حد استاندارد کپک و مخمر در اسـتاندارد دوغ ایـران یعنـی 100 Cfu/ml مـی‌باشـد). ایـن امـر، نشان‌دهنده قدرت ضدمیکروبی سویه مذکور می‌باشد اما نمونه شـاهد همان‌طور که در شکل1، مشخص مـی‌باشـد در روز 50 نگهـداری از لحاظ ارزیابی کپک و مخمر مثبت بوده است.



شکل 1- نمونه شاهد بعد 50 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد



شکل 2- نمونه دوغ تلقیح شده با سویه *لاکتوباسیلوس برویس* M_410^6 بعد از 60 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

جدول 5، نتایج کپک و مخمر،کلیفرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در طی 21 روز نگهداری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد را گزارش می‌کند. کپـک و مخمـر نمونـه شـاهد در روز 14 نگهـداری غیرقابل شمارش است ولی نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6 بعد 21 روز نگهداری از لحاظ ارزیابی میکروبی و کپـک و مخمـر منفـی بوده است. اکثـر بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیـک دارای فلاووپـروتئین اکسیداز می‌باشد که در حضور اکسـیژن، تولیـد پراکسـید هیـدروژن (H_2O_2) می‌کنند. پراکسید هیدروژن در محیط تجمع مـی‌یابـد زیـرا باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تولید کاتالاز ندارد. اثر ضدمیکروبی پراکسید هیدروژن به اثر اکسـیدکنندگی قـوی روی سـلول بـاکتری نسـبت داده شـده اسـت و باعـث تخریـب سـاختار مولکـولی اصـلی پروتئین‌های سلول باکتری می‌شود (Condon, 1987).

در جدول 6، نتایج کپک و مخمر،کلیفرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در طی14 روز نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گزارش شـده اسـت. تسـت کپـک و مخمـر نمونـه شـاهد در روز 7 نگهداری مثبت وغیرقابل قبول و نمونـه دوغ تلقـیح شـده بـا سـویه M_410^6 بعد از 14 روز نگهداری از لحاظ ارزیابی میکروبی و کپک و مخمر منفی و قابل قبول بوده است. *اشرشـیاکلی* در هـر سـه دمـای نگهداری منفی بود. کاهش pH دوغ در طی زمان نگهـداری، موجـب مهار بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود. به دلیل pH پایین دوغ (کمتر از 4/5)، باکتری‌های بیماری‌زایـی چـون *اشرشـیاکلی* در ایـن فراورده قدرت ادامه حیات به مدت طولانی را ندارند. مطالعات نشـان می‌دهد که در نمونه‌های آزمایشی دوغ، تعـداد بـاکتری *اشرشـیاکلی* تلقیح شده با تعداد 7 log cfu/ml، پس از 2 هفته نگهداری در دمای یخچال، به 1 log cfu/ml کاهش یافت. بقای *اشرشیاکلی* به دمـای نگهداری نیز بستگی دارد. در دمای اتاق، بقای *اشرشیاکلی* در مقایسه با شرایط نگهداری در دمای یخچال، افزایش مـی‌یابـد (مظـاهری و همکاران، 1395).

همانطور که در شکل 3 و 4، مشخص است نمونه شاهد از لحاظ ارزیابی کپک و مخمر در روز 7 نگهداری مثبت بوده ، اما نمونـه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6، ارزیابی کپک و مخمر و سایر باکتری‌های عامل فساد مذکور بعد 14 روز نگهداری، منفی می‌باشد



شکل 3- نمونه دوغ شاهد روز 7 نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد



شکل 4- نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6 بعد 14روز نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد

جدول 5- نتایج میکروبی نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد

	روز	Control	M_210^6	M_210^8	M_410^6	M_410^8
کپک و مخمر	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	غیر قابل شمارش	-	$1/1×10^3$	-	-
	روز 21	غیر قابل شمارش	$1×10^2$	غیر قابل شمارش	-	$8×10^2$
کلیفرم	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	-	-	-	-	-
	روز 21	$1/5×10^2$	-	$1×10^2$	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	-	-	-	-	-
	روز 21	$4×10^2$	-	-	-	-
اشریشیاکلی	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	-	-	-	-	-
	روز 21	-	-	-	-	-

نتایج میکروبی نمونه های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25 درجه سانتیگراد بصورت میانگین دوتکرار

-: منفی و عدم رشد میکروارگانیسم

جدول 6- نتایج میکروبی نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37درجه سانتی‌گراد

	روز	Control	M_210^6	M_210^8	M_410^6	M_410^8
کپک و مخمر	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	غیر قابل شمارش	-	$1/2×10^3$	-	-
	روز 14	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	-	غیر قابل شمارش
کلیفرم	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	-	-	-	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	$4×10^2$	-	$1/2×10^3$	-	-
اشرشیاکلی	تولید	-	-	-	-	-
	روز 7	-	-	-	-	-
	روز 14	-	-	-	-	-

نتایج میکروبی نمونه های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37 درجه سانتیگراد بصورت میانگین دو تکرار

-: منفی و عدم رشد میکروارگانیسم

ارزیابی حسی

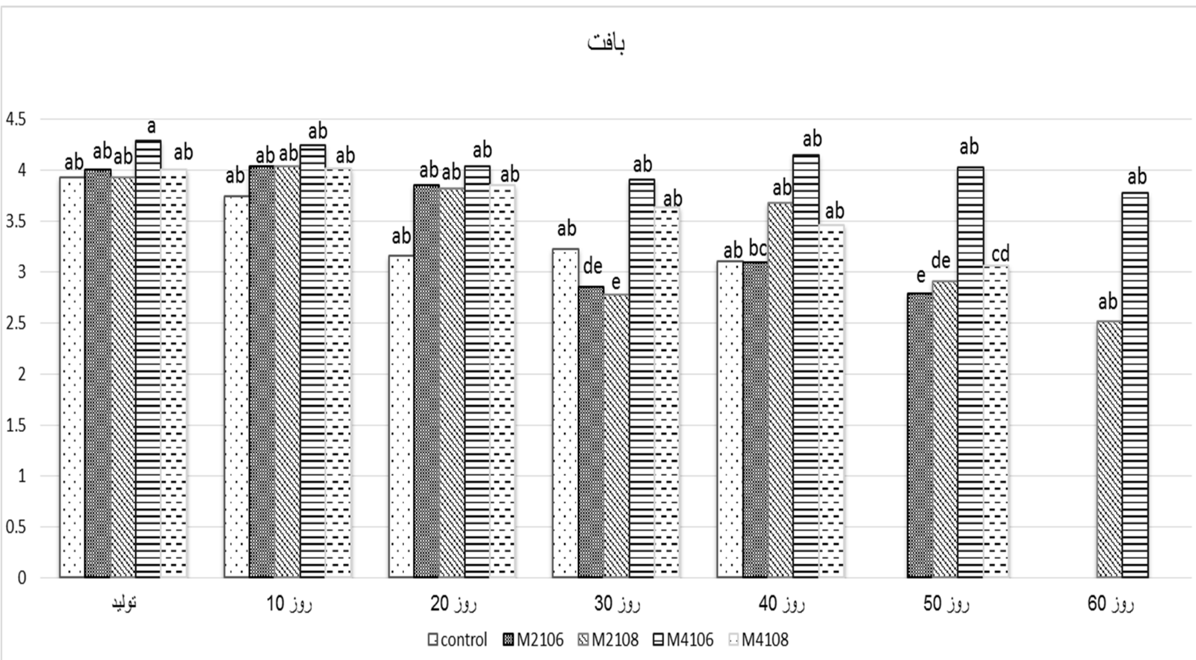
نتایج آنالیز حسی، موید این حقیقت است کـه نمونـه‌هـای دوغ تلقیح شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*، ویژگی‌هـای حسـی بهتری داشتند و از لحاظ ارزیابی حسی نسبت به نمونه شاهد، امتیاز بیشتری را کسب کردند.

کسب امتیاز مطلوب، احتمالاً به دلیل تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌استیل، اسید استیک و دیگر اسیدهای آلی بـوده کـه در آرومـای محصولات لبنی تاثیر دارند. باکتری‌های اسید لاکتیک انواع مختلفی از ترکیبات ضدمیکروبی از قبیل اسید لاکتیک و اسید استیک تولیـد می کنندکه موجب کـاهش pH در تخمیـر شـده و همچنـین مولـد ترکیباتی مانند پراکسید هیدروژن، اسید فرمیک، اسید پروپیونیـک و دی‌استیل می‌باشند (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

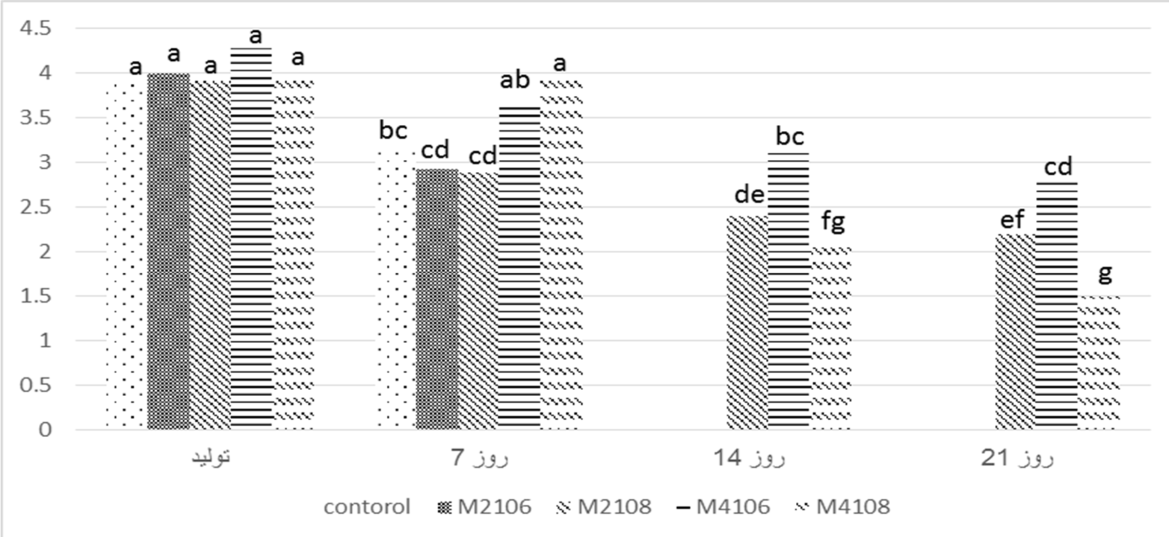
شاخص بافت

بیشترین امتیاز برای شاخص بافت، را نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M4106 در دماهای 4، 25 و37 درجه سانتی‌گراد کسب نمود و کمترین امتیاز بافت مربوط به نمونه شاهد (شکل 5، 6 و 7) بوده، که احتمالاً این برتری به دلیل تولید متابولیت‌هایی توسط دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* M2 و M4 می‌باشد. امتیاز مربوط به بافت نمونه‌های دوغ در طی زمان نگهداری، در هر سه دما، روند کاهشی نشان داد که این روند در تحقیقی که توسط Joseph Yun و همکاران (1993)، روی پنیر تولیدی با مایه پنیر آنزیمی انجام شده بود، مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که عوامل موثر بر تغییرات بافت در مراحل اولیه نگهداری با انتهای نگهداری متفاوت است. رطوبت و pH از عوامل موثر بر تغییرات بافت طی مراحل اولیه نگهداری می‌باشد (Lawrence *et al.*, 1987). بر اساس جداول 1، 2 و 3، تغییرات pH نمونه‌های دوغ در سه دمای نگهداری (4، 25 و 37 درجه سانتی‌گراد) در طی دوره نگهداری دوغ، روند کاهشی نشان داده است که این روند کاهشی pH، می‌تواند دلیلی بر روند کاهشی امتیاز بافت نمونه‌های دوغ در طی دوره نگهداری باشد.

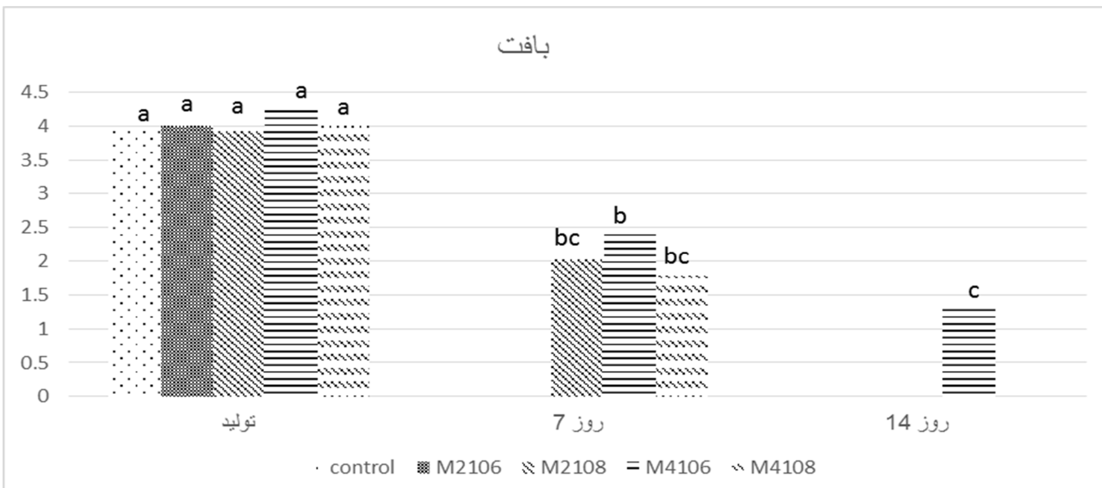
Azizi و همکاران (2017) در تحقیق خود نشان دادند که دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* (M2 و M4) ترکیبات ضدمیکروبی و شبه باکتریوسینی تولید کرده که بر روی ویژگی‌های حسی محصول می‌توانند تاثیرگذار باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید اگزوپلی‌ساکارید و دیگر متابولیت‌ها، موجب افزایش قابل توجه ویسکوزیته و یک ساختار لزج و لعابی می‌شود که با افزایش درصد تلقیح باکتری میزان ویسکوزیته، افزایش یافته، به‌طوری که نمونه‌های تولید شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* بالاترین امتیاز بافت را دارا هستند. اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در ضمن فرایند تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، موجب کاهش دوفاز شدن شده و تاثیر زیادی بر بافت فراورده‌های لبنی تخمیری دارد و موجب بهبود بافت محصول تخمیری می‌شود (مظاهری و همکاران، 1395).



شکل 5- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (بافت) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد.



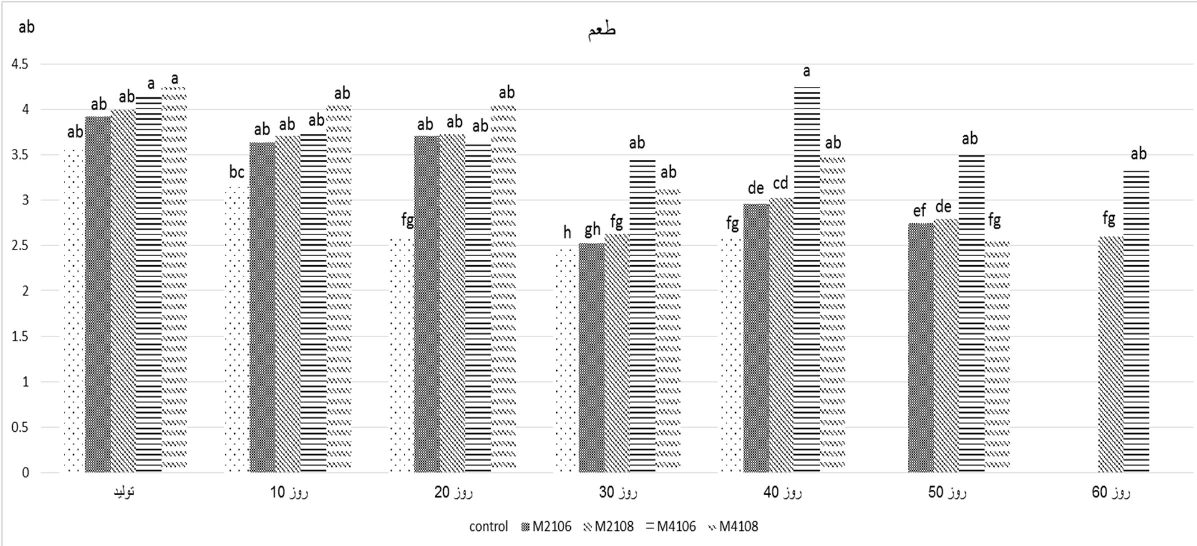
شکل 6- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (بافت) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25درجه سانتی‌گراد



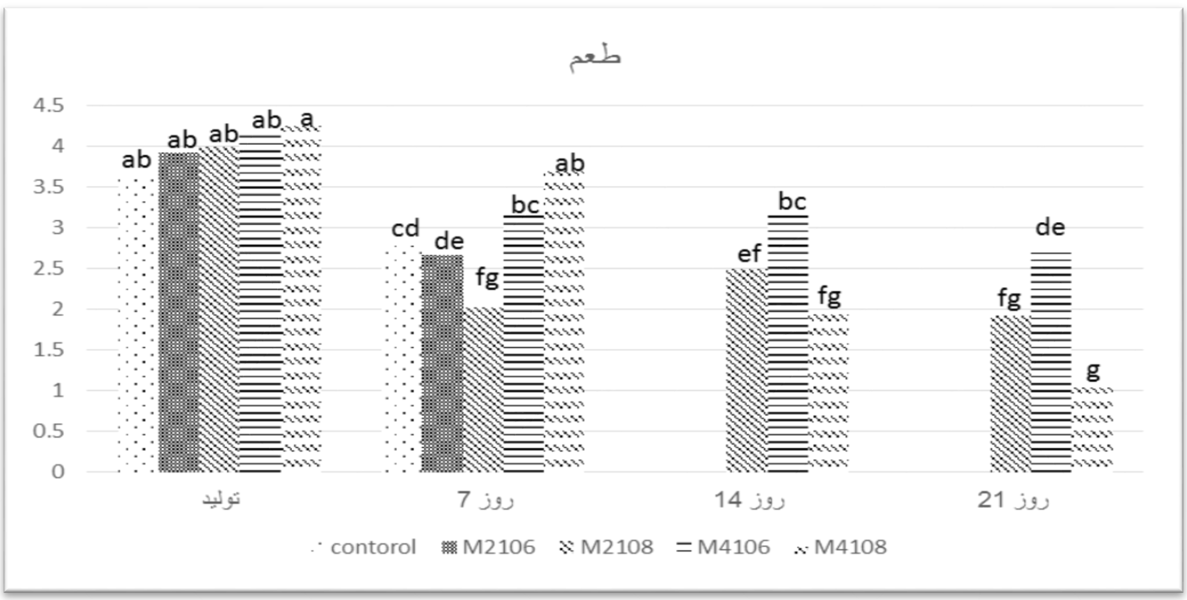
شکل 7- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (بافت) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37درجه سانتی‌گراد

شاخص طعم

در ارزیابی طعم، بر اساس شکل‌های 8، 9و 10 بیشترین امتیاز دردمای 4 درجه سانتی‌گراد، تا 20 روز اول نگهداری مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^8 و از روز 20 تا روز 60 نگهداری، بیشترین امتیار طعم مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6 می‌باشد. در دمای 25 درجه سانتی‌گراد تا روز 7 نگهداری بیشترین امتیاز مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^8 ولی در روز 7 به بعد نگهداری نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6 مطلوب‌تر بوده است که احتمالا به‌دلیل افزایش زیاد اسیدیته و کاهش pH، نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^8 می‌باشد وکمترین امتیاز برای نمونه شاهد حاصل شد. در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در روز تولید بیشترین امتیاز برای نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^8 و در روز 7 و 14 نگهداری نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^6 بیشترین امتیاز را حاصل کرده و کمترین امتیاز مربوط به نمونه شاهد بوده است. دی استیل آرومای مشخصه ترکیبات کره دارای اثرات ضدمیکروبی در pH پایین می‌باشد و به‌وسیله برخی از گونه‌های جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک در طی تخمیر سیترات تولید می‌شود. اگرچه مقدار دی استیل مورد نیاز برای اعمال فعالیت ضدمیکروبی نزدیک به 200 میلی‌متر می‌باشد اما به طرز چشمگیری باعث تغییر طعم و مزه محصول می‌شود(Earnshaw, 1992).



شکل 8- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (طعم) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد



شکل 9- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (طعم) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25درجه سانتی‌گراد.

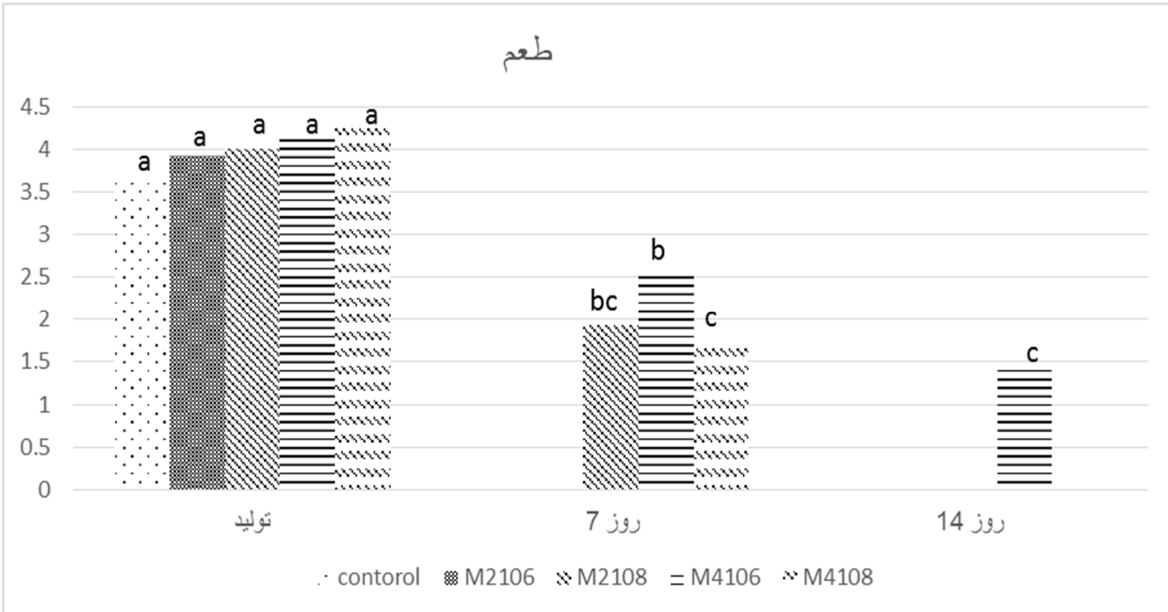
شاخص رنگ

در ارزیابی رنگ، بر اساس جدول‌های 11، 12 و 13کسب بیشترین امتیاز برای شاخص رنگ دردمای 4، 25 و 37 درجه سانتی‌گراد در روز تولید برای نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_210^8 می‌باشد واز روز تولید به بعد بیشترین امتیاز برای نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M_410^8 و M_410^6 حاصل شد و کمترین امتیاز مربوط به نمونه شاهد می‌باشد. کسب امتیاز بهتر رنگ برای نمونه‌های دوغ تلقیح شده با سویه‌های لاکتوباسیلوس، به احتمال زیاد مربوط به متابولیت‌های تولیدی آنها می‌باشد.

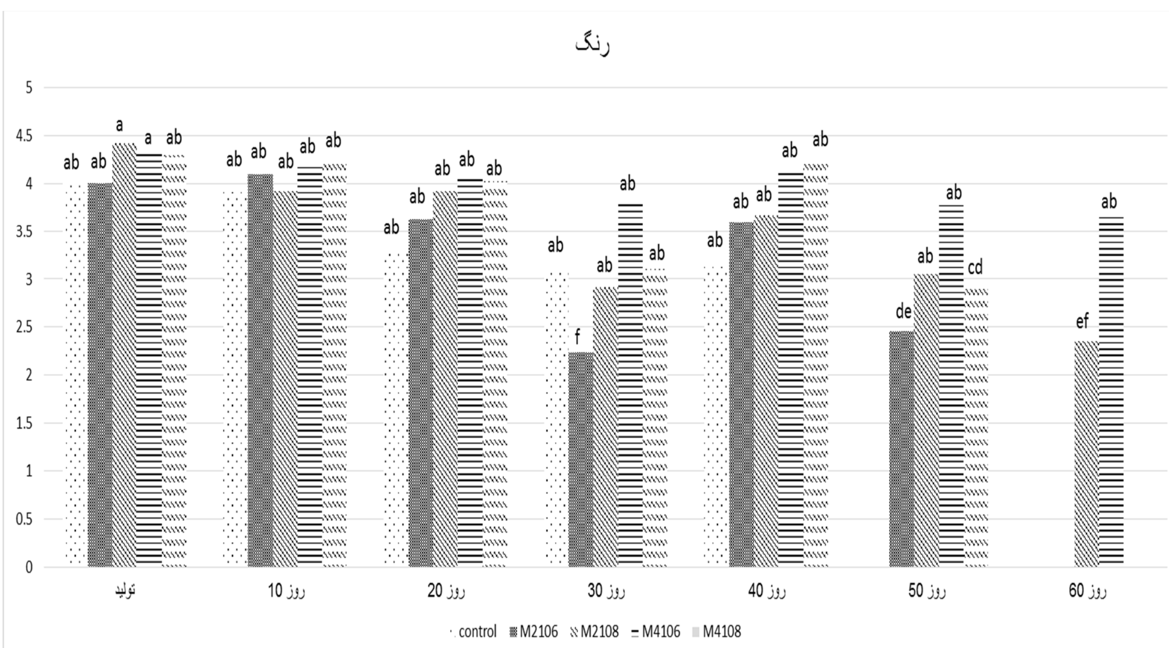
پذیرش کلی

در ارزیابی پذیرش کلی، مطابق جدول‌های 14، 15 و 16کسب بیشترین امتیاز برای پذیرش کلی در دماهای 4، 25 و 37 روز تولید مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M2108 و از روز تولید به

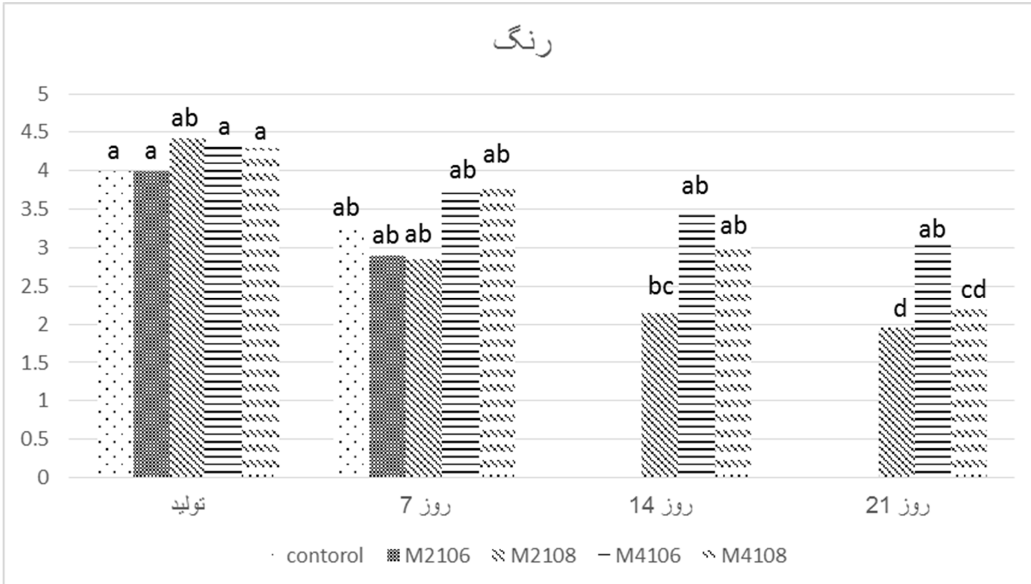
بعد بیشترین امتیاز پذیرش کلی مربوط به نمونه دوغ تلقیح شده با سویه M4106 می‌باشد. آغازگرهای لبنی عمدتاً کشت‌های تهیه شده باکتری‌های اسید لاکتیک است که در تولید انواع محصولات لبنی مانند کره، پنیر، ماست و شیرهای تخمیری به‌کار می‌رود. هدف عمده کاربرد این لاکتوباسیلوس‌ها توانائی تخمیر لاکتوز و تولید اسید لاکتیک است. مطالعات انجام شده نشان‌دهنده فوائد متعدد تکنولوژیکی و توانایی ایجاد عطر و طعم در فراورده‌های لبنی می‌باشد (Marth, 2001)..



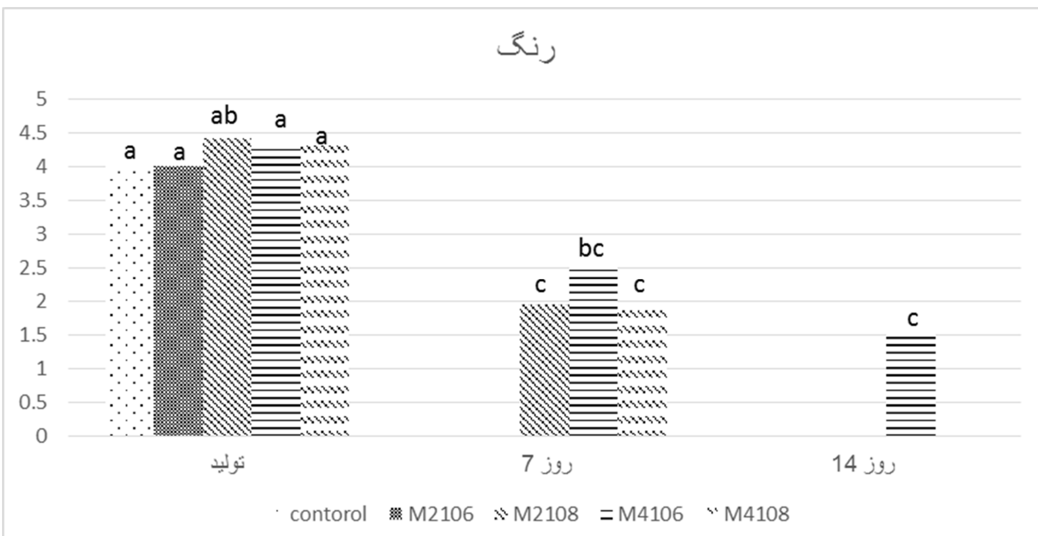
شکل 10- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (طعم) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد



شکل 11- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (رنگ) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد



شکل 12- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (رنگ) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد

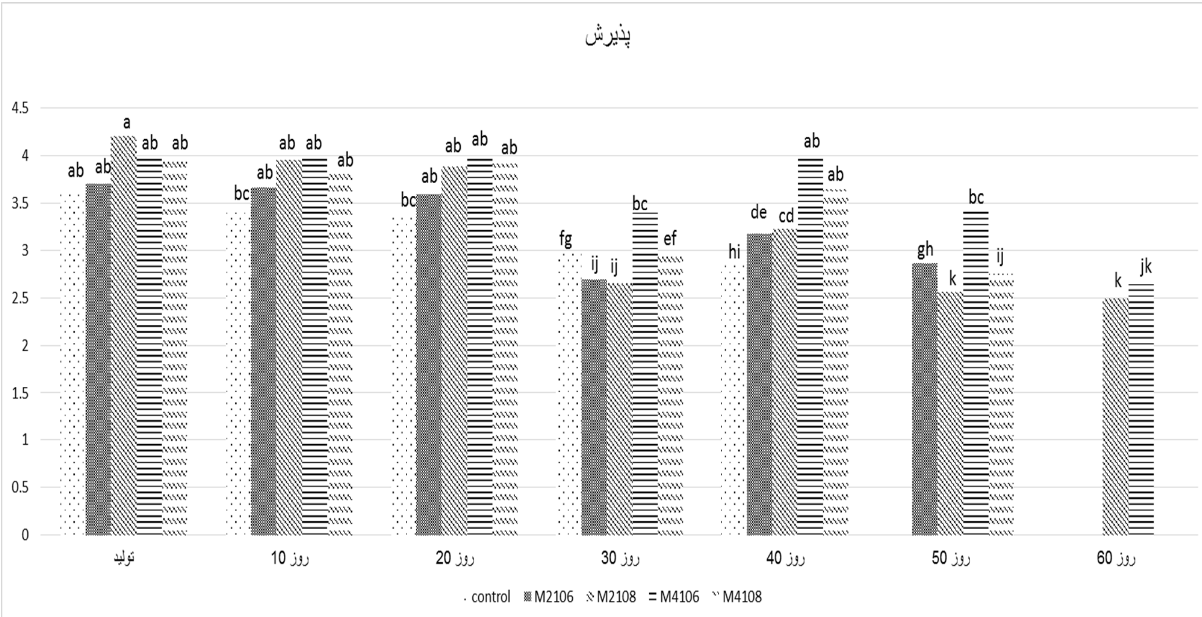


شکل 13- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (رنگ) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد

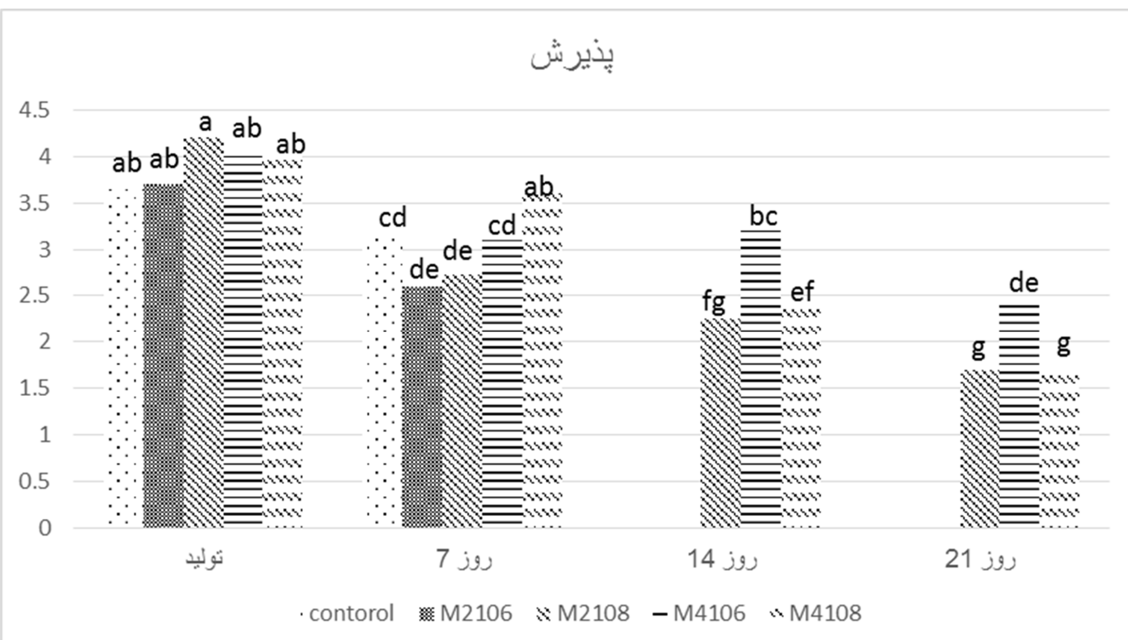
مانطور که نتایج نشان می دهند نمونه های دوغ تلقیح شده بـا سویه‌های لاکتوباسـیلوس بـا قابلیـت بیشـترین زمـان نگهـداری و همچنین کسب امتیاز مطلوب، از لحاظ ارزیابی حسی برتری داشتند. همچنین نتایج آنالیز حسی (پذیرش کلی) (شکل 16) نشان داد کـه نمونه دوغ تلقیح شده با سویه لاکتوباسیلوس M4106 ایزوله شده از پنیر متال، تا روز 14 نگهداری، به دلیل خاصیت ضـدمیکروبی ایـن سویه، تنها نمونه دوغ است که موجب بهبود شاخص حسی محصول و افزایش عمر انبار مانی محصول شده است.

به‌منظور بررسی تولید گاز در دوغ یک نمونه تلقیح شده با سویه M4106 (تحقیقاتی) و یک نمونه دوغ صنعتی به‌عنوان نمونه شاهد در گرمخانه 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نتایج نشان داد نمونه شاهد در روز سوم نگهداری دچار بمباژ و ترکیدن درب بطری شد اما نمونه دوغ تحقیقاتی در روز 7 نگهداری در گرمخانه، میزان کمی گاز تولید کرد که مربوط به هتروفرمنتاتیو بودن سویه مربوطه می‌باشـد. همچنین یک نمونه دوغ تحقیقاتی با یک نمونه دوغ صنعتی به‌عنوان شاهد در دمای اتاق قرار داده شد که نتایج نشان دادند نمونه شـاهد

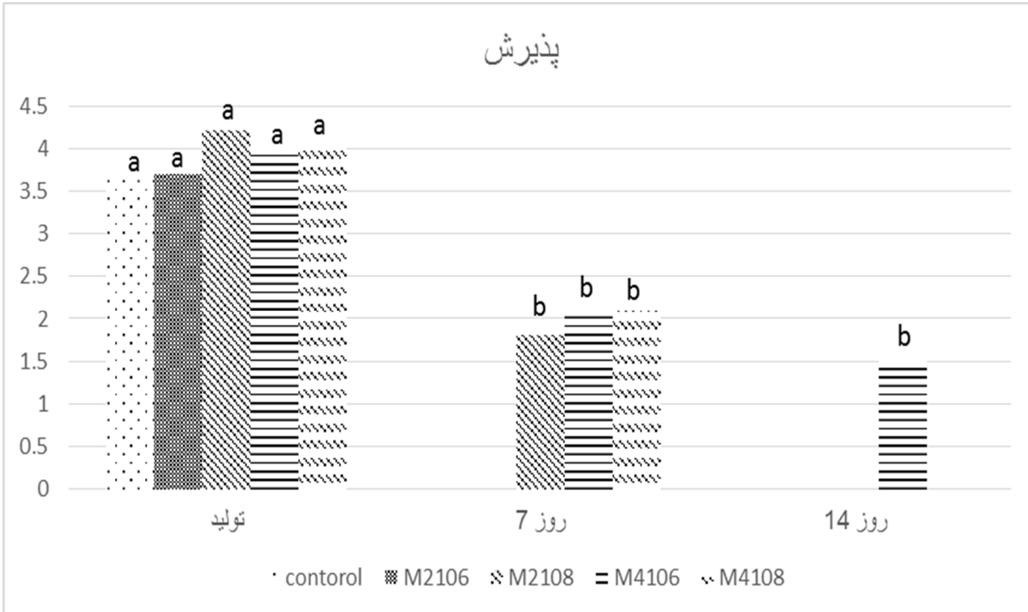
در روز 14 نگهداری مقدار زیادی گاز تولید کرده اما نمونه دوغ تولید شده با سویه مذکور هیچ تولید گازی نداشت و کاملا سالم بود.



شکل 14- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (پذیرش کلی) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد



شکل 15- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (پذیرش کلی) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 25درجه سانتی‌گراد



شکل 16- مقایسه میانگین نتایج آنالیز حسی (پذیرش کلی) نمونه‌های دوغ تولیدی طی دوره نگهداری در دمای 37درجه سانتی‌گراد



شکل 17- نمونه شاهد روز سوم و نمونه دوغ تحقیقاتی روز هفتم نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی دو سویه باکتری‌های اسید لاکتیک ایزوله شده از پنیر سنتی ایران (متال) در دوغ به‌منظور جلوگیری از فعالیت مخمرهای مولد گاز، این پژوهش انجام شد. نتایج موید این حقیقت بود که سویه *لاکتوباسیلوس برویس* $M_4 10^6$ دارای بیشترین قدرت ضدمیکروبی و همچنین افزایش قابل توجه در زمان ماندگاری دوغ و کاهش تولید گاز در بطری گردید.

منابع

عزیزی، ف .،حبیبی نجفی،م .ب .،عدالتیان،م .ر .،1395، شناسایی جدایه های باکتریهای جنس لاکتوباسیلوس از پنیر متال حاصل از شیر خام به روش های سنتی و مولکولی ، علوم و صنایع غذا یی شماره 68 ،صفحات 92-83.

علیزاده، ص .ا .،جمالی فر،ح .،صمدی، ن .،عیدی،ا .،فاضلی، م .ر .،1389 ، تأثیر نمک طعام بر رشد و ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوسهای جدا شده ازخمیر ترش نانهای سنتی استان مرکزی ،مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال پنجم، شماره3، صفحات 56-47.

خمیری، م.،عیسی زاده رازلیقی، س.،نصرالله زاده، ا.،1395 ،بررسی فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس وانتروکوکوس فاسیوم جدا شده از چال (شیر تخمیری شتر) بر مخمرهای عامل فساد مواد غذایی در دوغ، مهندسی بیوسیستم ایران، دوره 47,شماره ،4زمستان (1395ص)64

مظاهری تهرانی، م. ، قدس روحانی، م. ، امین میری، م. ،1395 ، توسعه و تولید ماست و سایر فرآورده های لبنی فراسودمند، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد شماره 657 صفحات 172و176

Ashurst, P.R., 2005, Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices 2nd ed . Blackwell Publishing, pp.57-62.

Azizi, F., Habibi Najafi, M. B., Edalatian Dovom, M. R. 2017. The biodiversity of *Lactobacillus*

spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. AMB express.7:176-186.

Bonestroo, M. H., Dewit, J. C., Kusters, B. J. M., & Rombouts, F. M., 1993. Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. International *Journal of Food Microbiology*, 17, 311–320.

Cangella, F., Ovidi, M., Paganini, S., Vettraino, A.M., Bevilacqua, L. and Trovatelli, L.D.,1998. Survival of undesirable micro-organisms in fruit yoghurts during storage at different temperatures. *Food Microbiol* 15, 71–77.

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N.,2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370.

Clevend, j., Montviie, T.J.,Nes, I.F. & Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: safe , natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.

Condon, S.,1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Reviews, 46, 269–280.

Crowley, S., Mahony, J., & Van Sinderen, D., 2012, Comparative analysis of two antifungal Lactobacillus plantarum isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1417-1427.

Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Miunier, G.,& Barbier, G.,2012 , Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures, *Food Control*, 30 (2013) 206e213

Earnshaw, R. G.,1992. The antimicrobial action of lactic acidbacteria: *Natural food preservation systems*. In B. J. B. Wood(Ed.), The lactic acid bacteria in health and disease (pp. 211–232). New York: Elsevier.

Edalatian , M.R. , Habibi Najafi, M.B., Mortazavi, S.A., Alegria, A., Nassiri, M.R., Bassami, M.R.,& Mayo, B., 2012 , Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches, *Dairy Science and Tecnology*,92,75-90.

Eklund, T., 1989. Organic acids and esters. In G. W. Gould (Ed.), Mechanisms of action of food preservation procedures (pp. 161–200). *New York: Elsevier.*

El-Mabrok , A. S. W., Hassan, Z. , Mokhtar, A. M. , & Hussin, K. M. A. , 2013 , Antifungal Activity of Lactobacillus plantarum LAB-C5 and LAB-G7 *Isolated from Malaysian Fruits*

, *Acta Biologica Malaysiana*, 2(1): 22-30

Gülmez, M., Güven, A., Sezer, Ç., Duman, B., 2003. Evaluation of microbiological and chemical quality of ayran samples marketed in Kars and Ankara cities in Turkey.kafkas. *Univ.Vet.Med*. J. 9, 49-52.

Guo, J., Mauch, A., Galle, S., Murphy, P., Arendt, E. K., Coffey, A., 2011, Inhibition of growth of Trichophyton tonsurans by Lactobacillus reuteri, *Journal of Applied Microbiology*, 474-483.

Kariptas, E., Tulumolu, S.,& Erdem, B., 2010 , Kafkas Univ Vet Fak Derg , Antifungal Effects of Lactobacillus spp. *Bacteria on Candida Yeast* , 16 (6): 1061-1064

Lawrence R, Creamer L, Gilles J. 1987. Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Scienc*. 70(8):1748-60.

Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J.,1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149–164.

Marth E.H. & Steel J. L., 2001. Applied dairy microbiology.Marcel Dekker, lnc, *second edition.pages*:327-343.

Nayyeri, N., Edalatian, M.R., Habibi Najafi, M.B., & Bahreyni, M., 2017 , Effect of Lactobacillus plantarum strains isolated from different stages of production Lighvan cheese on Rodotorulla mucilaginosa as a spoilage indicator in fruit juice, *Iranian Food Science and Technology Research Journal pages*: 596-608

Ozkaya, F., Karabicak, N., Kayali, R., & Esen, B., 2005, Inhibition of yest isolated from traditional Turkish Cheeses by Lactobacillus spp., *International Journal of Dairy Thechnology*,58(2), 111-114.

Papagianni, M., 2003, ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21, 465-499.

Pitt, J.J. and Hocking, A.D., 1999. Fungi and Food Spoilage, 2nd edn. Gaithersburg, MD: Aspen Publications.

Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., & Sinderen, D. van. 2008, Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104, 915–923.

Stiles, M.E., 1996, Biopreservation by lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek, 70, 331–345

Strom, K., 2005. Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria. PhD Thesis: Swedish University of Agricultural Sciences.

Sweeney, M. and Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *Int J Food Microbiol* 43, 141–158.

Tamang, J.P., Fleet, G.H., 2009. Yeasts diversity in fermented foods and beverages. In: Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Springer, Dordrecht Netherlands*, pp. 169-198.

Tamime AY and Robinson RK, 2001. Yoghurt: science and technology. 2nd Ed. CRC Press,

England. pp: 249-305, 535-587.

Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N., 2009, Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products, *Food Control*, 21 (2010) 136–142

Wang, H., Shi, J., Zhang, H., & Qi, W., 2011, a survey of some antifungal properties of lactic acid bacteria isolates from koumiss in China, *International Journal of Dairy Technology*, and 64,585-590

Woolford, M. K., 1984a. The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. *Grass and Forage Science*, 39, 75–79.

Woolford, M. K., 1984b. The antimicrobial spectra of some salts of organic acids and glutaraldehyde in respect to their potential as silage additives. *Grass and Forage Science*, 39, 53–57

Yang, E.J. , & Chan, H.C., 2010, Purification of a new antifungal compound produced by Lactobacillus plantarum AF1 isolated from kimchi , *International Journal of Food Microbiology*, 139 , 56-63.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 829-846

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص. 846- 829

Evaluation of antimicrobial Activity of Two Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Motal Cheese on shelf life of Yoghurt drink (Doogh)

S. Afzali[1], M. R. Edalatian Dovom[2]*, M. B. Habibi Najafi[3], M. Mazaheri Tehrani[3]

Received: 2018.01.31
Accepted: 2018.06.12

Introduction: Yoghurt drink or Doogh has gained great attention in recent years in different countries. On the other hand, this desirable commodity has showed some drawbacks especially from microbial point of view. One of the main problems in Doogh production and storage is considered to be the presence and activity of gas producing microorganisms especially in warm conditions and environments. From the consumer point of view, blowing of container is not acceptable and is regarded as a defect. Since lactic acid bacteria (LAB) possess the potential use as adjunct or co-culture in fermented dairy products for inhibition of gas – producing microorganisms' especially gas-producing yeasts in doogh, inclusion of these bacteria (LAB) can be a solution for this problem in aforementioned product. In this study, antimicrobial effects of two selected strains of *Lactobacillus brevis* assigned as M2 and M4 isolated from Motal cheese were investigated on the gas-producing and food spoilage microorganisms in Doogh.

Materials and methods: Two strains of lactobacillus namely M2 (*Lactobacillus brevis* KX572376) and M4 (*Lactobacillus brevis* KX572378) were selected from traditional Motal cheese isolates. Doogh production was carried out according to National Iranian Standard No. 2453. Each of these two strains was inoculated in Doogh at two levels of 10^6 and 10^8 cfu / ml and control sample was taken without inoculation followed by subjecting to microbial and sensory analysis at three temperatures of 4, 25 and 37°C, at intervals of 10, 7 and 7 days, respectively. Microbial profiles including coliforms, *E. coli*, Mold & yeast and *Staphylococcus aureus* were determined according to National Iranian Standard Number (2 and 1) –5486, 5234 and 5486, 997 and 6806, respectively. Sensory evaluation was carried out according to Iranian National Standard No. 4691. Sensory evaluation parameters such as taste, texture, color and total acceptance were evaluated by 10 senior food industry students.

Results and discussion: The results showed that sample inoculated with M_410^6 strain, received the highest score for antimicrobial activity at all three storage temperatures. Results demonstrated that, at 4 ° C, the control sample was contaminated (spoiled) on 50^{th} day and was positive for mold and yeast count, but sample inoculated with M_410^6 was acceptable (negative) for mold and yeast count. At 25 C, mold growth was detected in control sample on the 14th day of storage, but the sample inoculated with M_410^6 remained completely un-spoiled until the 21st day. At 37°C, the control sample on day 7 was positive for mold and yeast count, but the sample inoculated with M_410^6, mold and yeast was not detected until the 14th day. Coliform, Staphylococcus and *Escherichia coli* counts in M_410^6 sample were negative. Sensory evaluation was carried out according to Iranian National Standard No. 4691.Sensory evaluation data showed that samples inoculated with M_410^6 were superior to the control sample. Doogh samples inoculated with *Lactobacillus brevis* strains experienced acceptable sensory evaluation so that they gained better score than control sample. The highest score was obtained for the M_410^6 sample. The texture of the Doogh samples showed a decreasing trend at all three temperatures during the storage period. Moisture and pH are factors influencing texture changes during the initial stages of storage. Based on the taste evaluation results, at 4°C, the highest score was related to M_410^8 until day-20, but from the 20th to the 60th day of storage, the M_410^6 has gained the highest one. At 25°C until day 7, the highest score belonged to sample M_410^8 but from this day on, M_410^6 has been more favorable. At 37°C on production day, highest score for the M_410^8 sample but on day- 7 and 14, the M_410^6 took the highest score. Regarding to color index, M2108 has gained the highest score at all 3 temperatures on the production day and for the rest of storage time, the highest scores were obtained for the M4108 and M4106 samples. Maximum total acceptance, was obtained for M2108 on the

1. MSc. Student of Food Microbiology, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM).
2. Associate Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM).
3. Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM).
(*Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)

production day but this was replaced by M4106 for the rest of the time .The results showed that the Lactobacillus strain M4106 strain had the highest antimicrobial activity and the optimum score for sensory evaluation, as well as a significant increase in Doogh shelf life and reduced gas production in the bottle.

Key words: Motal cheese, *Lactobacillus brevis*, Antimicrobial activity